

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 6 月 16 日 (16.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/054474 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/52,
15/61, A01H 5/00, C02F 3/32

[JP/JP]; 〒6068502 京都府京都市左京区北白川追分町
国立大学法人 京都大学大学院 農学研究科内 Kyoto
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018665

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 3 日 (03.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-407508 2003 年 12 月 5 日 (05.12.2003) JP

(74) 代理人: 杉村 興作 (SUGIMURA, Kosaku); 〒1000013
東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 4 号 霞山ビルディ
ング 7 F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人 京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP];
〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 泉井 桂 (IZUI,
Katsura) [JP/JP]; 〒6068502 京都府京都市左京区北白
川追分町 国立大学法人 京都大学大学院 生命科学研究
科内 Kyoto (JP). 陳麗梅 (CHEN, Limei) [CN/JP]; 〒
6068502 京都府京都市左京区北白川追分町 国立大学
法人 京都大学大学院 生命科学研究科内 Kyoto (JP).
加藤 暢夫 (KATO, Nobuo) [JP/JP]; 〒6068502 京都府
京都市左京区北白川追分町 国立大学法人 京都大学
大学院 農学研究科内 Kyoto (JP). 阪井 康能 (SAKAI,
Yasuyoshi) [JP/JP]; 〒6068502 京都府京都市左京区北
白川追分町 国立大学法人 京都大学大学院 農学研究
科内 Kyoto (JP). 由里本 博也 (YURIMOTO, Hiroya)

(54) Title: METHOD OF IMPARTING FORMALDEHYDE-TOLERANCE TO PLANT AND METHOD OF MAKING PLANT
TO ABSORB ENVIRONMENTAL FORMALDEHYDE

(54) 発明の名称: ホルムアルデヒドに対する耐性を植物に付与する方法、環境中のホルムアルデヒドを植物に吸収
させる方法

(57) Abstract: A transformant plant having a formaldehyde metabolic pathway via the Calvin cycle is obtained by transferring a
hexulose-6-phosphate synthase gene and a 6-phosphohexulose isomerase gene into a plant and expressing them in the chloroplast.
This transformant plant has a tolerance to formaldehyde and makes it possible to significantly decrease environmental formaldehyde.
Therefore, it is expected that this plant contributes to environmental purification when located in a house, an office, etc.

(57) 要約: 本発明により、ヘキスロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び6-ホスホヘキスロースイソメラーゼの遺伝
子を植物に導入して葉緑体内において発現させることにより、カルビン回路を介してホルムアルデヒドを代謝させ
る経路を有する形質転換植物が与えられた。本発明の形質転換植物は、ホルムアルデヒドに対する耐性を有し、か
つ環境中のホルムアルデヒドを有意に低減させることが可能である。よって本発明の形質転換植物を住居やオフィ
スなどに設置することにより、環境浄化を行うことができると考えられる。

WO 2005/054474 A1

明 細 書

ホルムアルデヒドに対する耐性を植物に付与する方法、環境中のホルムアルデヒドを植物に吸収させる方法

技術分野

本発明は、ホルムアルデヒド代謝系酵素の遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を該植物に付与することにより、ホルムアルデヒドに対する耐性を植物に付与する方法及び該方法により作製された形質転換植物に関する。更に本発明は、ホルムアルデヒド代謝系酵素の遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化させる能力を該植物に付与することよりなる、環境中のホルムアルデヒドを植物に吸収させる方法及び該方法により作製された形質転換植物に関する。

背景技術

ホルムアルデヒドは建築資材などに存在している化学物質であり、大気中においてごく微量であっても人体に影響を及ぼすために、シックハウス症候群などの原因物質とされている。平成 15 年 7 月 1 日の建築基準法の改正により、ホルムアルデヒドを放散する建築資材の使用が禁止されるなど、環境基準の規制は今後より厳しくなることが予想される。そこで環境汚染物質の低減（例えば植物を利用したファイトレメディエーション）の観点から環境中のホルムアルデヒド濃度を低減し、除去する方法が求められていた。

なお、環境中のホルムアルデヒド濃度を生物学的な手段により低減させる技術として、ホルムアルデヒドを分解する微生物などを用いた方法が知られている。しかし、植物の代謝系の酵素を組み込んだ形質転換植物を作製することにより、

該植物を用いてホルムアルデヒド濃度を低減させる技術はこれまで知られていない。また植物において遺伝子組み換えを行うことにより、各種ストレスに対する耐性を付与する技術は存在するが、環境浄化という観点から代謝遺伝子系を組み込んでいる例は見出されない。

なお植物を用いた環境浄化の報告の一例として、ナス科、アブラナ科、セリ科、アカザ科、マメ科、キク科、ユキノシタ科の植物に、アグロバクテリウム・リゾゲネス由来のRⁱプラスミドを導入して誘導される毛状根に、ダイオキシン含有媒体を接触させて、ダイオキシンを毛状根又は再生植物体に吸収・分解させることを特徴とするダイオキシン含有媒体の浄化方法（特開 2000-176433 号公報）がある。しかしこの報告はホルムアルデヒドに関するものではない。

また植物におけるホルムアルデヒドの代謝に関する知見としては、シロイヌナズ由来のグルタチオン依存性のホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (FALDH) の発現量を操作した植物体を作製したことが報告されている (Plant Physiol. 2003)。その結果 FALDH を過剰発現させた植物体においてはホルムアルデヒドの取り込みが促進されたが、FALDH の発現量を低下させた植物体においてはホルムアルデヒドの取り込みが明らかに低下し、この結果より FALDH がホルムアルデヒドの解毒に関与していることが示唆される。

ところで微生物において、メタノールなどの炭素数 1 つの化合物 (C1 化合物) を炭素源として生育できるメタノール資化性菌の存在が知られている。かかる微生物においてはメタノールから生じるホルムアルデヒドを炭素源として固定することができる代謝経路を備えている。そしてヘキサコース-6-リン酸合成酵素と 6-ホスホヘキサコースイソメラーゼはメタノール資化性菌におけるその様な代謝経路に関与している。

それに関して、メタノール資化能を有さない微生物である *Burkholderia capacia* TM1 に、メタノール資化性菌由来の上記遺伝子の酵素を導入して過剰発現させたところ、ホルムアルデヒドの取り込みが増加し、バニリン酸を代謝して

ホルムアルデヒドを生成する代謝経路も活性化していることが報告されている (Appl. Environ Microbiol. 2003)。かかる知見は、非メタノール資化性菌においてもヘキサコース-6-リン酸合成酵素／6-ホスホヘキサコースイソメラーゼの経路により、バニリン酸の分解能を改善することができることを示している。

発明の開示

よって本発明の課題は、環境中におけるホルムアルデヒド濃度を低減させるために、ホルムアルデヒドの代謝系を植物などに組み込むことにより該植物においてホルムアルデヒド吸収能を高める手段を提供することである。かかる植物はホルムアルデヒドに対する耐性を有していると考えられるが、植物などにおいてホルムアルデヒド耐性を高める手段を提供することもまた本発明の課題である。また、かかる手法を植物のみならず自家栄養生物一般に拡張することも本発明の課題である。

よって本発明は、カルビン回路を有する自家栄養生物においてホルムアルデヒドの代謝酵素系の遺伝子を導入して該代謝酵素系を人工的に発現せしめ、よって該自家栄養生物にホルムアルデヒドに対する耐性を付与する方法を提供するものである。かかる形質転換自家栄養生物もまた本発明の範囲内である。

更にカルビン回路を有する自家栄養生物においてホルムアルデヒドの代謝酵素系の遺伝子を導入して該代謝酵素系を発現せしめ、よって該自家栄養生物にホルムアルデヒドを吸収させる方法を提供するものである。かかる形質転換自家栄養生物もまた本発明の範囲内である。

更に本発明は、ヘキサコース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサコースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を該植物に付与することよりなる、ホルムアルデヒドに対する耐性を植物に付与する方法を提供するものである。かかる形質転換植物もまた本発明の範囲内である。

更に本発明は、ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を該植物に付与することよりなる、環境中のホルムアルデヒドを植物に吸収させる方法を提供するものである。かかる形質転換植物もまた本発明の範囲内である。

本発明により、ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現させることにより、カルビン回路を介してホルムアルデヒドを代謝する経路を有する形質転換植物を作製することが可能となった。そのような形質転換植物は、ホルムアルデヒドに対する耐性を有し、かつ環境中のホルムアルデヒドを有意に低減させることが可能である。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の方法によりホルムアルデヒド資化能を付与するためのストラテジーを示した図である。

第2図は、実施例で使用した *rmpA* 遺伝子または *rmpB* 遺伝子を含む DNA コンストラクトの構造を示す図である。

第3図は、*rmpA* 遺伝子を含むプラスミドを構築するストラテジーを示す図である。

第4図は、*rmpB* 遺伝子を含むプラスミドを構築するストラテジーを示す図である。

第5図は、*rmpA* 遺伝子を含むプラスミドのプライマー、トランジットペプチド、*rmpA* 遺伝子の配列を示す図である。

第6図は、*rmpB* 遺伝子を含むプラスミドのプライマー、トランジットペプチド、*rmpB* 遺伝子の配列を示す図である。

第7図は、シロイヌナズナにおいて、形質転換植物とコントロール植物の植物体の新鮮重量に対してホルムアルデヒドが及ぼす影響を示すグラフである。

第8図は、シロイヌナズナにおいて、形質転換植物とコントロール植物における

HPS 活性と PHI 活性を示すグラフである。

第 9 図は、シロイヌナズナにおいて、形質転換植物とコントロール植物における、ホルムアルデヒド耐性とホルムアルデヒドの取り込みを示す写真である。

第 10 図は、シロイヌナズナにおいて、形質転換植物とコントロール植物における液体ホルムアルデヒドの取り込みの取り込み率を示すグラフである。

第 11 図は、タバコにおいて、形質転換植物とコントロール植物における HPS 活性と PHI 活性を示すグラフである。

第 12 図は、タバコにおいて、形質転換植物とコントロール植物における、ホルムアルデヒド耐性とホルムアルデヒドの取り込みを示す写真である。

第 13 図は、タバコにおいて、形質転換植物とコントロール植物における、ホルムアルデヒドに対する耐性を示す写真である。

第 14 図は、タバコにおいて、ホルムアルデヒドが形質転換植物とコントロール植物の根の生育に及ぼす影響を示す写真である。

第 15 図は、rmpA 遺伝子が発現している植物系統 (A-1)、rmpB 遺伝子が発現している植物系統 (B-1)、それらの交雑種 (A-1×B-1) におけるホルムアルデヒド耐性を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、ヘキサロース-6-リン酸合成酵素 (Hexulose-phosphate synthase:以下 HPS と称する) 遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼ (Phosphohexuloisomerase:以下 PHI と称する) 遺伝子を植物に導入することにより、該植物にホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を付与することができることを見出した。

即ち、有害な化学物質であるホルムアルデヒドがカルビン回路に取り込まれて資化されるので、環境中のホルムアルデヒドを該植物により吸収させ、ホルムアルデヒド濃度を低減させることが可能である。言い換えれば、本発明の形

質転換植物は、カルビン回路を通じてホルムアルデヒドを代謝する経路を有しているため、環境中のホルムアルデヒドを処理することができる。また、かかる形質転換植物はホルムアルデヒドに対する耐性を有すると考えられる。

本発明のストラテジーを図 1 に示す。カルビン回路の中間生成物であるリブローース-5-リン酸 (Ru5P) が、HPS によって触媒される酵素反応によりホルムアルデヒド (HCHO) と結合し、3-ヘキスローース-6-リン酸が生成する。そして生成した 3-ヘキスローース-6-リン酸は PHI の作用によってフルクトース-6-リン酸 (Fru6P) に変換される。Fru6P はカルビンサイクルの中間生成物でもあるために、結果としてホルムアルデヒドはカルビン回路の中間体に組み込まれてカルビンサイクルの代謝系を介して資化される。

なお図 1 において RuBP はリブローース-1.5-ビスリン酸を、FBP はフルクトース-1.6-ビスリン酸を、Xu5P はキシルローース-5-リン酸を示す。また rmpA は HPS をコードする遺伝子であり、rmpB は PHI をコードする遺伝子であり、これらの遺伝子を含むコンストラクトを構築した。上記の rmpA 遺伝子と rmpB 遺伝子を含むコンストラクトを構築するためのストラテジーについては、下記の実施例において詳しく述べる。

HPS の遺伝子と PHI の遺伝子が導入されることによりそれらの酵素を過剰発現している形質転換植物は、環境中のホルムアルデヒドの処理能力が高められている。HPS と PHI を発現させることにより、カルビンサイクルの経路を介してホルムアルデヒドを代謝するための新たな代謝経路を与えたという点に本発明の最も顕著な特徴がある。そのような本発明の思想の範囲内で種々の改変を適宜施して本発明を実施することが可能である。

下記の実施例で詳しく述べるように、かかる形質転換植物は空気中のホルムアルデヒドの濃度を低減させるのに有効であった。またかかる形質転換植物はホルムアルデヒドに対して耐性を示した。なお本発明に係る酵素である HPS と PHI のアミノ酸配列、およびそれらの酵素をコードする遺伝子の塩基配列自身は既知で

ある (accession No.: AB034913)。

環境中のホルムアルデヒド濃度を低減することを可能とする本発明に係る技術は、種々の用途に応用することができると考えられる。例えば、観葉植物、ガーデニング植物や街路樹などに HPS の遺伝子と PHI の遺伝子を導入することができる。かかる遺伝子導入植物は大気、土壌、水等環境中の環境汚染物質の低減（ファイトレメディエーション）に有効である。また、農業、水産業、工業などで用いられた残留ホルムアルデヒドの処理に、本発明に係る形質転換植物は有用である。

本発明の形質転換植物を作製するために、HPS の遺伝子を発現させるための DNA コンストラクトと、PHI の遺伝子を発現させるための DNA コンストラクトを構築する。かかる DNA コンストラクトは、HPS をコードする遺伝子又は PHI をコードする遺伝子を当然に有するが、これらの遺伝子上流に、該遺伝子の植物における発現を促進するためのプロモーター配列、および該遺伝子を目的部位（例えば葉緑体）で発現させるためのトランジットペプチド、更には薬剤耐性によって形質転換体を選抜するための薬剤耐性遺伝子も更に有する。本発明の方法は光合成に関連しているカルビン回路を利用したものであるので、HPS と PHI を葉緑体において発現させることは本発明において好ましい態様である。

使用するプロモーター配列は特に限定されるものではないが、下記の実施例で使用了 PrbcS は、作用が強力であり且つ光合成と相関性が高いために特に好適である。しかし、その他の本技術分野で汎用されている種々のプロモーターを使用することもできる。また使用する薬剤耐性遺伝子も特に限定されるものではないが、下記の実施例で使用了 ゲンタマイシン耐性遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子は好適であり、その他本技術分野で汎用されている種々の薬剤耐性遺伝子を使用することができる。なおこれらの薬剤耐性遺伝子は形質転換体の選抜については有効であるが、抗生物質耐性の拡散は社会的には好ましくないことを考えると、形質転換体が市場におかれる段階においては薬剤耐性が除去されていること

が望ましいと考えられる。

上記の DNA コンストラクトを、植物の芽やカルスに導入することにより形質転換を行う。形質転換の方法としては、アグロバクテリウム法、プロトプラスト法、PEG 法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などの種々の方法が知られている。好適な実施態様として下記の実施例においてはアグロバクテリウム EHA101 pMP90 を用いているが、必要に応じて種々の遺伝子導入方法を適宜用いることができる。そして薬剤耐性を指標として遺伝子が導入された形質転換体を選抜することにより、形質転換植物を得ることができる。また一般的に外来遺伝子の発現は高くはないが、これらのコンストラクトに挿入されているプロモーターの作用のために HPS をコードする遺伝子と PHI をコードする遺伝子の発現は増強され、その効果を発揮することができる。

ここで遺伝子を導入する対象の植物は特に限定されるものではない。下記の実施例においては代表的な植物としてシロイヌナズナとタバコに酵素の遺伝子を導入しているが、他の多くの植物にも HPS をコードする遺伝子と PHI をコードする遺伝子を同様に導入し、ホルムアルデヒドの除去・吸収能を付与できることは当業者ならば理解できることである。好適な植物にはナス科の植物やアブラナ科の植物、その他種々の双子葉植物が含まれるが、植物の種類はそれに限定されるものではなく、例えば単子葉植物にも理論的には本発明の方法を適用できるものと考えられる。

具体的な植物の例としては、観葉植物やガーデニング植物としては、ポトス、パキラ、ベンジャミン、コンシンネ、クレストゴールド、サンスベリアなどを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。また街路樹としては、サクラ、ケヤキ、イチョウ、プラタナス、ユリノキ、ポプラ、カエデなどを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

また本発明の方法は植物のみならず、カルビン回路を有する自家栄養生物一般に適用可能であると思われる。ここで自家栄養生物とは光合成又はそれに類似す

る反応を行う機能を有し、 H_2O と CO_2 から有機物を作ることができる生物であって、従属栄養生物を除外する意味である。具体的な例としては、植物一般の他に、光合成細菌、ラン藻（シアノバクテリア）や藻類などが挙げられる。これらの自家栄養生物はカルビン回路を有するために、同様の戦略を用いてこれらの生物においてホルムアルデヒド資化能を付与することも可能である。

ホルムアルデヒドをカルビンサイクルの回路を通じて代謝するための具体的な手段としては、下記の実施例で行っているように、HPS をコードする遺伝子と PHI をコードする遺伝子を植物に導入することが好ましい。しかし、その手段は上記の酵素をコードする遺伝子を導入することに必ずしも限定されるものではない。

例えばメタノール資化性酵母はジヒドロアセトンシンターゼ（DHAS）及びジヒドロアセトンキナーゼを有しており、酵母由来のこれらの酵素の働きによってホルムアルデヒドをキシロース 5-リン酸に固定してジヒドロキシアセトン 3-リン酸と 3-ホスホグリセリン酸を生成する。この反応において基質・生成物共にカルビン回路の中間体とほぼ共通であり、このような知見も本発明を実施するにあたって利用できるものと考えられる。

即ち、使用することができる他の酵素遺伝子として、ジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS1）をコードする遺伝子とジヒドロキシアセトンキナーゼをコードする遺伝子（DAK1）の組み合わせを採用することも可能である。上記において述べた様に、この場合には、ジヒドロアセトンシンターゼにより、キシロース 5-リン酸とホルムアルデヒドの反応が触媒されて 3-ホスホグリセリン酸とジヒドロキシアセトンが生成し、後者の生成物はジヒドロキシアセトンキナーゼ（DHAK）による酵素反応の触媒によりジヒドロキシアセトン 3-リン酸に変換され、よってカルビン回路を介して代謝系に組み込まれる。かかる態様も本発明において実施することが可能である。

このような態様も本発明の範囲内であり、本願明細書において「ホルムアルデヒドの代謝酵素系の遺伝子」とは、HPS をコードする遺伝子と PHI をコードする

遺伝子のみならず、例えば上記において述べたような、ホルムアルデヒドを代謝してカルビン回路に組み込むのに有用な他の酵素遺伝子も含む意味である。

下記の実施例において本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

実施例 1：シロイヌナズナを用いた解析

(コンストラクトの構築)

シロイヌナズナにおいて HPS と PHI を発現させるためのベクターとして、HPS をコードする遺伝子 (rmpA) と PHI をコードする遺伝子 (rmpB) を含む DNA コンストラクトを作製した。作製した 2 つの DNA コンストラクトの構造を図 2 に示す。なお、これらの DNA コンストラクトに、HPS と PHI をコードする遺伝子の他に、HPS と PHI を葉緑体において発現させるためのトランジットペプチドと、形質転換体を選抜するために薬剤耐性遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子) も挿入した。

そこで、rmpA 遺伝子を含む HPS 発現用のコンストラクトと、rmpB 遺伝子を含む PHI 発現用のコンストラクトを作製するためのストラテジーを図 3 と図 4 に示す。その rmpA 遺伝子と rmpB 遺伝子はマイコバクテリウム属のメタノール資化性菌である *Mycobacterium gastri* MB19 の同一オペロン内に位置している。なお本菌は原核生物であり、本菌のプロモーターは植物内においては作動しない。そのために rmpA 遺伝子と rmpB 遺伝子のコード領域のみを採って、形質転換用の植物プロモーターを含むキメラ遺伝子を構築した。

PCR により rmpA 遺伝子を増幅し (rmpA sense GCTTGCAAGGGGTAACCATGACG : 配列番号 1、rmpA antisense: TCTAGAGGATCAGGCGATCGC : 配列番号 2)、SphI と BamHI によって PCR 生成物と pUC-Rbcs-3C を切断した。単離した 624bp の rmpA 遺伝子と 4.6kb のベクター断片を単離し、該ベクターに rmpA 遺伝子を結合し、pUC-RbcS-rmpA プラスミドを作製した。HindIII と BamHI によって pUC-RbcS-rmpA

とバイナリーベクターpPZP221を消化し、2.4kbのpRbcS-rmpAインサートと10kbのベクターバンドpPZP211を単離し、それらを結合させてpPZP221 rmpAプラスミドを作製した。

なおトランジットペプチドの配列として使用した部分は accession No: X05986 の塩基番号 298-468 であり、rmpA 遺伝子の配列として使用した部分は accession No: AB034913 の塩基番号 2518-2150 である。このコンストラクトのプライマー、トランジットペプチド、rmpA 遺伝子の配列をまとめたものを図 5 に示す。

また PCR により rmpB 遺伝子を増幅し (rmpB sense GCTTGCAAGGGGTAACCATGACG : 配列番号 3、rmpB antisense: TCTAGATCCGGGTCCTCGAG : 配列番号 4)、SphI と XbaI によって PCR 生成物と pUC-Rbcs-3C を切断した。単離した 600bp の rmpB 遺伝子と 4.6kb のベクター断片を単離し、該ベクターに rmpB 遺伝子を結合し、pUC-RbcS-rmpB プラスミドを作製した。HindIII と XbaI によって pUC-RbcS-rmpB とバイナリーベクターpPZP221を消化し、2.4kbのpRbcS-rmpBインサートと10kbのベクターバンドpPZP221を単離し、それらを結合させてpPZP221 rmpBプラスミドを作製した。

なおトランジットペプチドの配列として使用した部分は accession No: X05986 の塩基番号 298-468 であり、rmpB 遺伝子の配列として使用した部分は accession No: AB034913 の塩基番号 1845-2456 である。このコンストラクトのプライマー、トランジットペプチド、rmpB 遺伝子の配列をまとめたものを図 6 に示す。

(形質転換体の選抜)

このようにして構築したプラスミドにより、アグロバクテリウム法を用いてシロイヌナズナを形質転換した。具体的にはシロイヌナズナ rmpA で形質転換した後に形質転換体を rmpA と共に導入したカナマイシン耐性により選抜し、更に、rmpB で形質転換した後に形質転換体を rmpB と共に導入したゲンタマイシン耐性により選抜することにより、rmpA と rmpB の両者の遺伝子が導入された形質転換体を選抜した。あるいは逆に、シロイヌナズナ rmpB で形質転換した後に形質転換体を

rmpB と共に導入したゲンタマイシン耐性により選抜し、更に、rmpA で形質転換した後に形質転換体を rmpA と共に導入したカナマイシン耐性により選抜することにより、rmpA と rmpB の両者のコンストラクトが導入された形質転換体を選抜した。

(導入された遺伝子の確認)

なおこのようにして作製したシロイヌナズナの形質転換植物について、RT-PCR とノザン解析により遺伝子が導入されているか検討を行った。その結果、rmpA 遺伝子と rmpB 遺伝子を含むコンストラクトで処理することにより、両者の遺伝子が導入された形質転換植物が得られていることが確認された。更に HPS に対する抗体を用いてウエスタン解析により導入された遺伝子の酵素蛋白質が発現しているか確認をしたところ、rmpA 遺伝子に由来した HPS 蛋白質の発現が確認された。

(ホルムアルデヒドに対する耐性)

これらの遺伝子 (rmpA、rmpB) を導入した形質転換植物とコントロール植物におけるホルムアルデヒド耐性を、植物体の新鮮重量により検討した (図 7)。抗生物質による選抜の後に抗生物質を含まない新たな寒天培地に苗を移し 1 週間生育させた。その後、ホルムアルデヒド (37%) を 100 ml あたり 50 μ l 添加した寒天培地に移し、4-5 週間生育させた後に新鮮重量を測定した。図 7 において上段はホルムアルデヒドを添加していない寒天培地における結果を、中段はホルムアルデヒドを 50 μ l 添加した寒天培地における結果を、下段はホルムアルデヒドを 80 μ l 添加した寒天培地における結果を、それぞれ示す。また図 7 において AB1 から AB5 は rmpA 遺伝子と rmpB 遺伝子の両者が導入された形質転換植物を、CK1 から CK5 はコントロール植物を示す。

その結果、ホルムアルデヒドを含まない環境下における植物体の新鮮重量は、コントロール群 (CK1-CK5) と両酵素の遺伝子が導入された形質転換体群 (AB1-AB5) の間で差が見られなかった (上段)。一方、ホルムアルデヒドを含む環境下では、形質転換体 (AB1-AB5) は良く生育したが、コントロール (CK1-CK5) では生育が

阻害され、植物体の新鮮重量に差が認められた（中段、下段）。この結果は、形質転換体はホルムアルデヒドに耐性を有していることを示している。

（酵素活性の測定）

HPS と PHI の酵素活性を 30℃ で分光学的に測定した。具体的にはリボース 5-リン酸を出発基質とし、HPS や PHI による酵素反応を介してホルムアルデヒドに依存的に生成する NADPH を 340 nm で検出することにより、酵素活性を測定した。即ち、30℃ で 2-3 分プレインキュベーションを行い、蛋白抽出物とホルムアルデヒド (50 mM) 50 μ l を添加して下記の酵素反応溶液中で酵素反応を行った。酵素反応溶液 1 ml の組成は以下の通りである。

KPB (カリウムリン酸緩衝液), pH7.5	50 mM
MgCl ₂	2.5 mM
Ri5P (リボース-5 リン酸)	2.5 mM
HCHO (ホルムアルデヒド)	2.5 mM
NADP ⁺	2.5 mM
PRI (ホスホリボイソメラーゼ)	10 U/ml
PGI (ホスホグルコイソメラーゼ)	10 U/ml
GDH (グルコースホスフェートデヒドロゲナーゼ)	10 U/ml
HPS (3-ヘキスロース-6-ホスフェイト合成酵素)	10 U/ml (植物蛋白抽出物 0.05 ml)
PHI (6-ホスホヘキスロースイソメラーゼ)	10 U/ml (植物蛋白抽出物 0.05 ml)
dH ₂ O	0.55 ml

なおこの反応液において、HPS の酵素活性を測定する際にはオーセンティックな PHI を使用し、PHI の酵素活性を測定する際にはオーセンティックな HPS を使

用した。

このようにして測定した HPS 活性と PHI 活性を図 8 に示す (図 8 左: HPS 活性、右: PHI 活性)。なお図 8 の上において酵素活性のアッセイの原理を示す。図 8 に見られるように、rmpA 遺伝子と rmpB 遺伝子の両方が導入されている AB1 と AB2 においては両者の酵素活性が検出された。また rmpA 遺伝子が導入されている A1 においては HPS 活性のみが、rmpB 遺伝子が導入されている A2 においては PHI 活性のみが検出された。

(ホルムアルデヒドの取り込み)

シロイヌナズナの苗 (各群 20 個体) を植物箱 (370 ml) の中に移し、ボルティンク段階に達するまで 3-4 週間生育させた。その後 50 μ l のホルムアルデヒド (37%) を 500 μ l のマイクロチューブに添加して植物箱の角に置いた。3-4 週間後に植物箱のカバーを、中央に孔を有している新しいものに交換した。ホルムアルデヒド検出器をその孔に設置し、ホルムアルデヒドの取り込みを検出した。検知管を設置して 3.5 時間後に測定を停止し、写真を撮影した。

形質転換体である AB1 (左側) と AB2 (中央)、更にコントロール (HPS の遺伝子と PHI の遺伝子を含まない空のベクターで形質転換した植物体) である CK (右側) における結果を図 9 に示す。図 9 の写真より、形質転換体において苗は良く生育しているが、コントロールにおいては生育が阻害されており、形質転換体はホルムアルデヒド耐性を示した。また 3.5 時間後におけるホルムアルデヒド濃度は、AB1 と AB2 については 4 ppm 程度であった。一方コントロール植物については 20 ppm 以上であり、AB1 と AB2 においては空気中のホルムアルデヒドが吸収されていることが確認された。なお検知管により検出される量は検出時間に比例するために、実際のホルムアルデヒド濃度は検知管の検出値を検出時間で割った値である。

更に水溶液中のホルムアルデヒドの取り込みについて検討を行った。抗生物質で選抜を行った後に、抗生物質を含まない MS 寒天培地上で苗を 2 週間生育させた。

植物体 0.3 g を 10 ml のホルムアルデヒド溶液に浸し、30 時間後に溶液中のホルムアルデヒド濃度を測定した。

その結果、コントロール（CK：左カラム）と比較して、形質転換体（AB：右カラム）においては顕著にホルムアルデヒドが減少していることが観察された（図 10）。なお図 10 において縦軸はホルムアルデヒドの残存率を示す。ことにホルムアルデヒドの初期濃度が 5 mM である場合において、形質転換体におけるホルムアルデヒドの残存率は約 10% まで低下し、コントロールと比較して顕著な相違が認められた。この結果もまた、形質転換体がホルムアルデヒドを取り込んでいることを示している。

実施例 2：タバコを用いた解析

（遺伝子の導入およびその確認）

シロイヌナズナにおける実験と同様に、*rmpA* 遺伝子と *rmpB* 遺伝子をタバコに導入して形質転換したタバコを作製した。PCR、ノザン解析により検討を行ったところ、*rmpA* 遺伝子と *rmpB* 遺伝子を導入した形質転換植物について、両者の遺伝子の存在が確認された。更にウエスタン解析により導入された遺伝子による蛋白質の発現を確認したところ、*rmpA* 遺伝子に由来して HPS 蛋白質が発現していることが確認された。

（酵素活性の測定）

作製した形質転換タバコ植物における HPS と PHI の酵素活性を図 11 に示す（上：HPS 活性、下：PHI 活性）。図 11 に見られるように、*rmpA* 遺伝子と *rmpB* 遺伝子が両方とも導入されている AB2、AB5、AB6 において、HPS と PHI の両者の酵素活性が検出された。また野生型（WT）とコントロール（CK）においては HPS と PHI の酵素活性は低かった。

（ホルムアルデヒドの取り込み）

形質転換したタバコを差し芽により増殖させ、抗生物質を含まない寒天培地中に移植して根を成長させた。2 週間後に 100 μ l のホルムアルデヒド（37%）を

植物箱 (370 ml) の中に入れて空気中に消散させた。2 カ月後にシロイヌナズナの場合と同様にホルムアルデヒド検出器を設置し、設置 4 時間後に測定を停止し、写真を撮影した。

形質転換体である AB5 (左側) と、コントロールである CK (右側) における結果を図 1 2 に示す。図 1 2 の写真より、形質転換体において苗は良く生育しているが、コントロールにおいては生育が阻害されており、形質転換体はホルムアルデヒド耐性を示した。また検知菅を設置してから 3.5 時間後における発色の程度から、植物箱内のホルムアルデヒド濃度は AB5 については 3 ppm 程度であった。一方コントロール植物については 20 ppm 以上であり、その差から、AB5 においては空気中のホルムアルデヒドが吸収されていることが確認された。

(ホルムアルデヒドに対する耐性)

抗生物質による選抜を行った後に、形質転換したタバコの芽を抗生物質を含まない MS 培地上に移し、1 週間生育させた。10 μ l の 37%ホルムアルデヒドをマイクロチューブに添加して植物箱の中に入れた。2 週間後、10 μ l のホルムアルデヒドを同じマイクロチューブ中に再補給した。更に 2 週間後にこの操作繰り返した。4 週間植物を生育した後に写真を撮影した (図 1 3)。図 1 3 において上段は形質転換体を、下段は野生型植物又はコントロール植物を示す。その結果、形質転換体 (AB7, AB8) においてはホルムアルデヒド処理 (図 1 3 : 上段の中央と右側) による影響は認められず、非処理群 (図 1 3 : 上段の左側) と差がなかった。一方、野生型 (WT) とコントロール (CK) においてはホルムアルデヒド処理により、非処理群との比較において明らかに成長阻害が認められた (図 1 3 : 下段の中央と右側)。

(タバコ植物における根の成長に対するホルムアルデヒドの影響)

抗生物質により選抜を行った後に、形質転換した芽を抗生物質を含まない MS 培地に移して 1 週間生育させた。ホルムアルデヒドをマイクロチューブに添加して植物箱に入れた。2 週間後に植物を取り出して、ホルムアルデヒドが根の生育

に及ぼす影響を検討した（図 1 4）。その結果、形質転換植物（AB5）においては 2 μ l のホルムアルデヒド（37%）処理は殆ど根の成長に影響せず、10 μ l のホルムアルデヒド（37%）処理においても根の成長が認められた（図 1 4：上段）。一方コントロール植物（CK）においては、2 μ l のホルムアルデヒド（37%）処理により、根の成長は明らかに抑制された（図 1 4：下段）。

（植物系統の交雑の検討）

rmpA 遺伝子が発現している植物系統（A-1）と、rmpB 遺伝子が発現している植物系統（B-1）を掛け合わせる交雑（A-1×B-1）を行い、その種子を採取した。抗生物質を含まない寒天培地上で 3 週間生育を行い、4 週間後に写真を撮影した（図 1 5）。左側に 20 μ l のホルムアルデヒドで処理したサンプルを、右側にホルムアルデヒド処理を行わなかったサンプルを示す。

その結果、HPS のみが発現している A-1（図 1 5：上段）と PHI のみが発現している B-1（図 1 5：中段）においては、20 μ l のホルムアルデヒド（37%）処理により生育が阻害された。一方両酵素が発現していると思われる A-1×B-1（図 1 5：下段）においては、ホルムアルデヒド処理により生育は影響されなかった。よってホルムアルデヒド耐性を獲得するには、HPS と PHI の両者が発現していることを要することが確認された。

産業上の利用可能性

本発明により、ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現させることにより、カルビン回路を介してホルムアルデヒドを代謝させる経路を有する形質転換植物が与えられた。本発明の形質転換植物は、ホルムアルデヒドに対する耐性を有し、かつ環境中のホルムアルデヒドを有意に低減させることが可能である。よって本発明の形質転換植物を住居やオフィスなどに設置することにより、環境浄化を行うことができると考えられる。

請 求 の 範 囲

1. カルビン回路を有する自家栄養生物においてホルムアルデヒドの代謝酵素系の遺伝子を導入して該代謝酵素系を発現せしめ、よって該自家栄養生物にホルムアルデヒドに対する耐性を付与する方法。
2. カルビン回路を有する自家栄養生物においてホルムアルデヒドの代謝酵素系の遺伝子を導入して該代謝酵素系を発現せしめ、よって該自家栄養生物にホルムアルデヒドに対する耐性を付与された、ホルムアルデヒドに対する耐性を有する形質転換自家栄養生物。
3. カルビン回路を有する自家栄養生物においてホルムアルデヒドの代謝酵素系の遺伝子を導入して該代謝酵素系を発現せしめ、よって該自家栄養生物にホルムアルデヒドを吸収させる方法。
4. カルビン回路を有する自家栄養生物においてホルムアルデヒドの代謝酵素系の遺伝子を導入して該代謝酵素系を発現せしめ、よって該自家栄養生物にホルムアルデヒドに対する耐性を付与された、ホルムアルデヒド吸収能を有する形質転換自家栄養生物。
5. ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を該植物に付与することよくなる、ホルムアルデヒドに対する耐性を植物に付与する方法。
6. 前記ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の作用によりリブリース-5-リン酸とホルムアルデヒドから 3-ヘキサロース-6-リン酸を生成し、更に前記 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの作用により 3-ヘキサロース-6-リン酸をフルクトース-6-リン酸に変換することよくなる、請求項 5 記載の方法。
7. ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を付与された、ホルムアルデ

ヒドに対する耐性を有する形質転換植物。

8. 前記植物が双子葉植物である、請求項 7 記載の形質転換植物。
9. 前記植物がナス科植物である、請求項 8 記載の形質転換植物。
10. 前記植物がタバコである、請求項 9 記載の形質転換植物。
11. 前記植物がアブラナ科植物である、請求項 8 記載の形質転換植物。
12. 前記植物がシロイヌナズナである、請求項 12 記載の形質転換植物。
13. ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を該植物に付与することによりなる、環境中のホルムアルデヒドを植物に吸収させる方法。
14. 前記ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の作用によりリブリース-5-リン酸とホルムアルデヒドから 3-ヘキサロース-6-リン酸を生成し、更に前記 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの作用により 3-ヘキサロース-6-リン酸をフルクトース-6-リン酸に変換することによりなる、請求項 13 記載の方法。
15. ヘキサロース-6-リン酸合成酵素の遺伝子及び 6-ホスホヘキサロースイソメラーゼの遺伝子を植物に導入して葉緑体内において発現せしめ、よってホルムアルデヒドをカルビン回路の中間体に資化する能力を付与された、ホルムアルデヒド吸収能を有する形質転換植物。
16. 前記植物が双子葉植物である、請求項 15 記載の形質転換植物。
17. 前記植物がナス科植物である、請求項 16 記載の形質転換植物。
18. 前記植物がタバコである、請求項 17 記載の形質転換植物。
19. 前記植物がアブラナ科植物である、請求項 16 記載の形質転換植物。
20. 前記植物がシロイヌナズナである、請求項 19 記載の形質転換植物。

FIG. 1

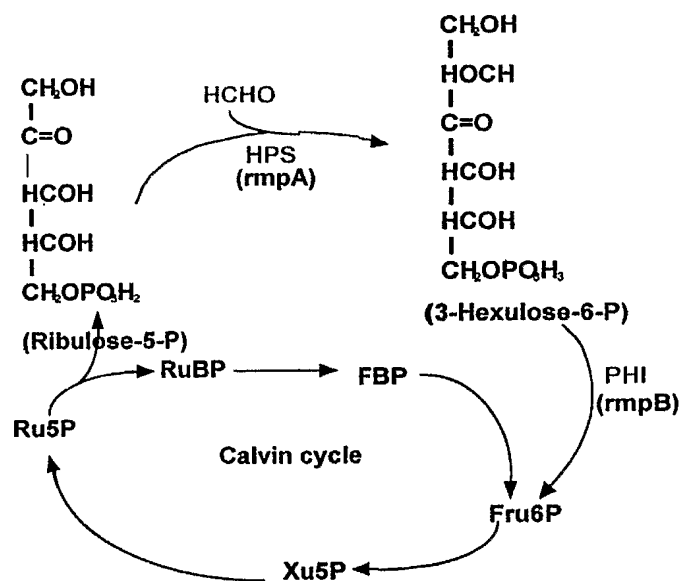


FIG. 2

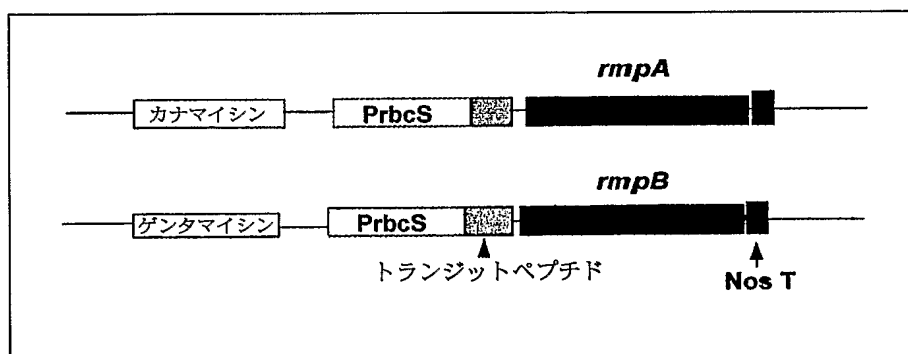


FIG. 3

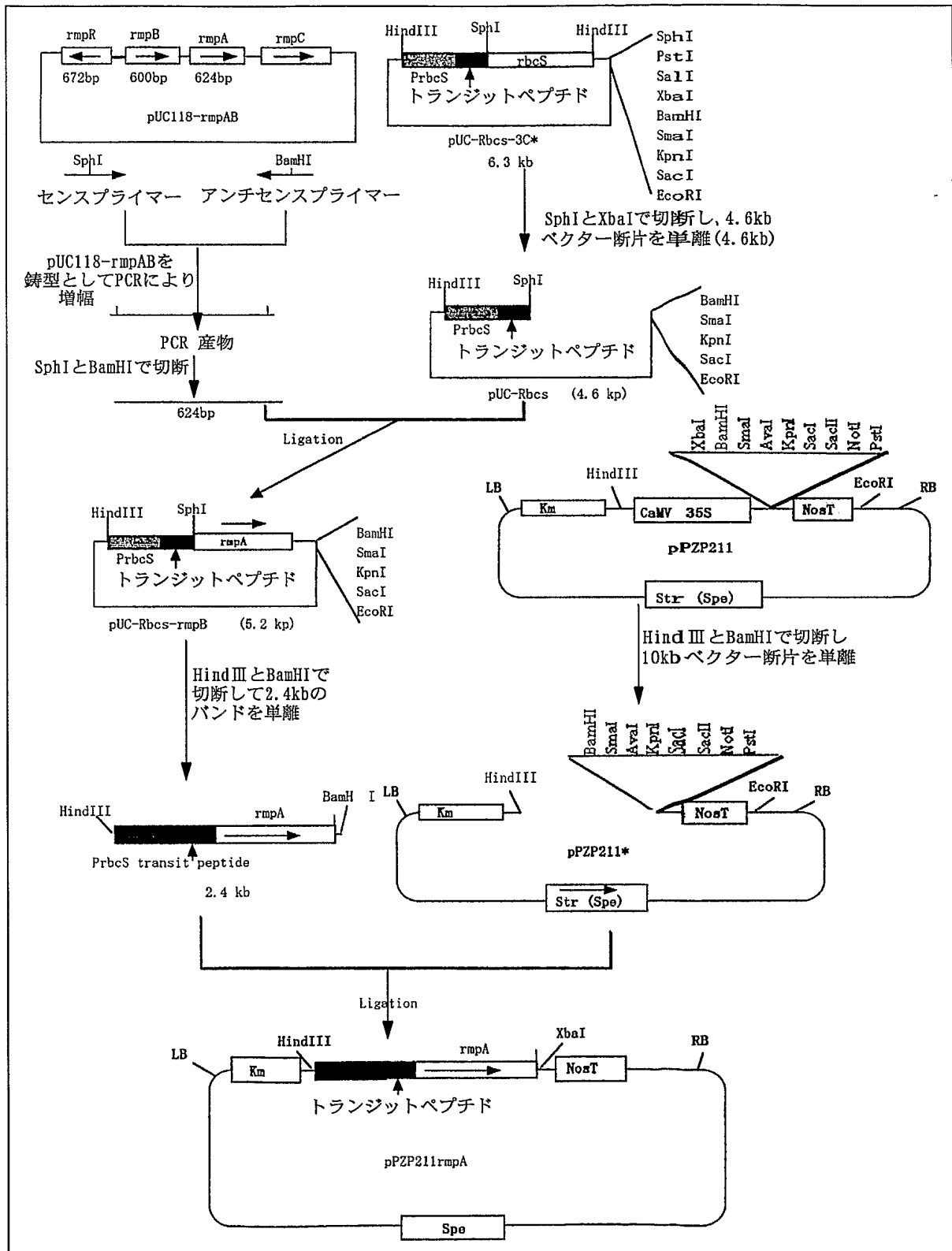


FIG. 4

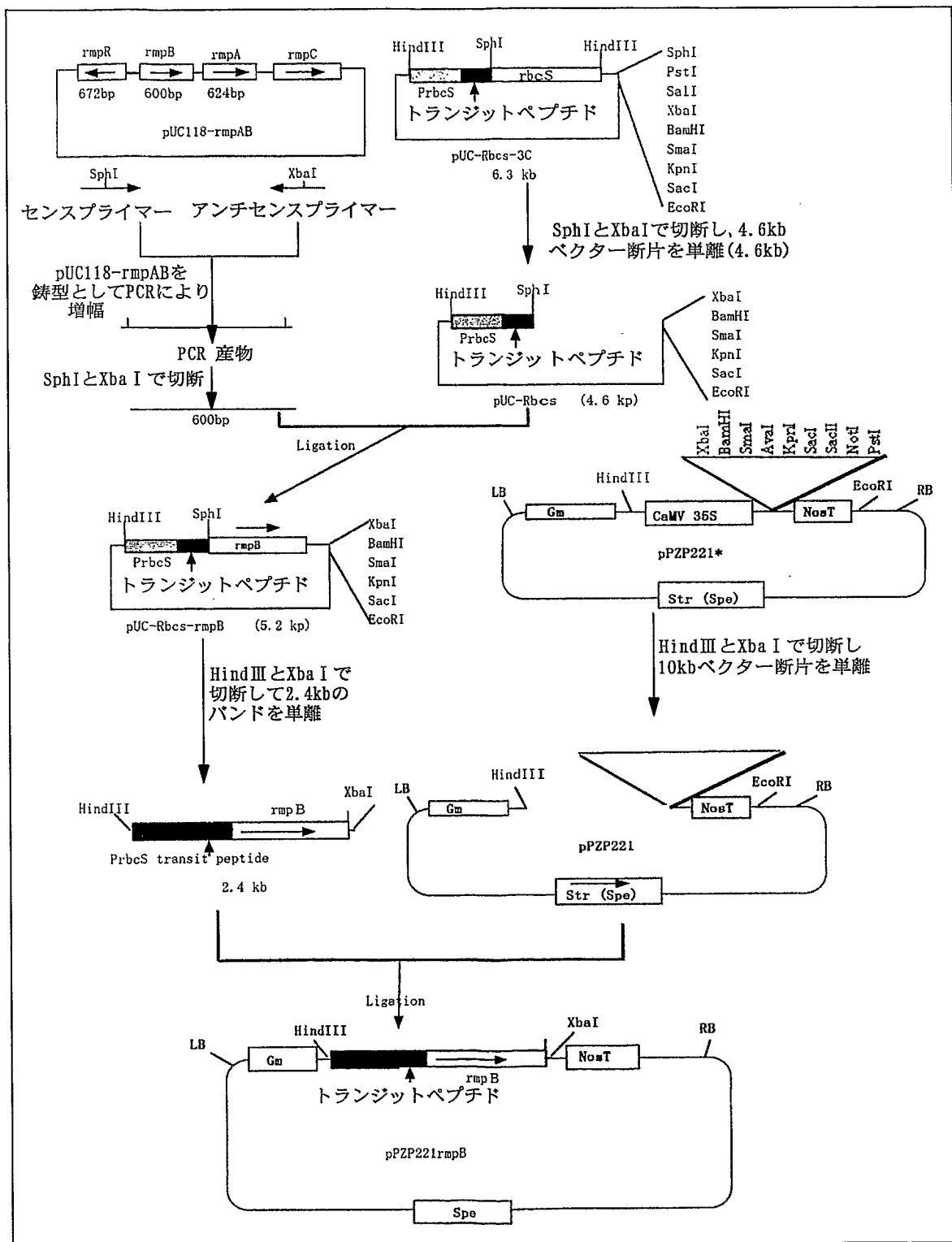


FIG. 5

PCRによってrmpA遺伝子を増幅するためのプライマー

rmpA-センス (2506-2530)

GCATGCAAGGGGTAACCATGACG

rmpA-アンチセンス (3150-3129)

TCTAGAGGATCAGGCGATCGC

トランジットペプチド配列

(accession: X05986)

atg

301 gotttcttcag taatgtcctc agcagctgtt gccacccgcg gcaatggtgc acaagctagc
361 atggttgcac ccttcactgg actcaagtcc accgcttctt tcctgtttc aaggaagcaa
421 aaccttgaca ttacctccat tgctagcaac ggtggaagag tcagttgc

rmpA遺伝子配列

(accession: AB034913)

atg

2521 aagctccaag tcgccatcga cctgctgtcc accgaagccg ccctcgagct ggccggcaag
2581 gttgccgagt acgtcgacat catcgaactg ggcaccccc tgatcgaggc cgagggcctg
2641 tcggtcatca ccgccgtcaa gaaggctcac ccggacaaga tcgtcttcgc cgacatgaag
2701 accatggacg ccggcgagct cgaagccgac atcgcgttca aggccggcgc tgacctggtc
2761 acggtcctcg gctcggccga cgactccacc atcgcgggtg ccgtcaaggc cgcccaggct
2821 cacaacaagg gcgtcgtcgt cgacctgata ggcacgcagg acaaggccac ccgtgcacag
2881 gaagttcgcg ccctgggtgc caagttcgtc gagatgcacg ctggtctgga cgagcaggcc
2941 aagcccggtc tcgacctgaa cggtctgctc gccgccggcg agaaggctcg cgttccgttc
3001 tocgtggccg gtggcgtgaa agttgcgacc atccccgcag tccagaaggc cggcgcagaa
3061 gttgccgtcg ccggtggcgc catctaoggt gcagccgacc cggccgccgc cgcgaaggaa
3121 ctgcgcgcgc cgatcgccctg atcctgatcg

開裂部位



MASSVMSSAAVATRGNGAQASMVAPFTGLKSTASFFVSRKQNLDTISIASNGGRVSC MKLQVAID
LLSTEAALELAGKVAEYVDI IELGTPLIEAGLSVITAVKKAHPDKIVFADMKTMDAGELEADIAFKAGADL
VTVLGSADDSTIAGAVKAAQAHNKGVVVDLIGIEDKATRAQEVRLGAKFVEMHAGLDEQAKPGFDLNGLLA
AGEKARVPFSVAGGVKVATI PAVQKAGAEVAVAGGAI YGAADPAAAKELRAAIA

FIG. 6

DNA sequence used for vector construction

PCRによってrmpB遺伝子を増幅するためのプライマー

rmpB-センス (1825-1850)

GCATGCAAGGGTAAACATGACG

rmpB-アンチセンス (2456-2435)

TCTAGATCCGGTCACTCGAG

トランジットペプチド配列 (accession: X05986)

301 gcttcttctcag taatgtcctc agcagctgtt gccacccgcg gcaatgggtgc acaagctagc atg
361 atgggttgac cttcactgg actcaagtcc accgcttctt tccctgtttc aaggaagcaa
421 aaccttgaca ttacctcat tgotagcaac ggtggaagag tcagttgc

rmpB遺伝子配列 (accession: AB034913)

atgacg caagccgcag
1861 aagccgacgg cgcgtgaag gtcgtcggag acgacatcac caacaacctt tcccttgttc
1921 gggacgaggt cgcggacacc gcggcgaaag tcgacccgga gcaggtggct gtcctcgctc
1981 gccaaatcgt ccagcctgga cgggttttcg tggcgggcgc cggtcgcagc gggctcgtcc
2041 tgcgcatggc cgcctatgcg ctgatgca ct tcggcctcac cgtgcacgtc gcgggcgaca
2101 ccaccacccc ggcaatctca gccggcgatc tgcgtctggt ggcttccggc tcgggcacca
2161 cctccggtgt ggtcaagtcc gccgagacgg ccaagaaggc cggggcgcg c atcgccgct
2221 tcaccaccaaa cccggtttct ccgctggccg gtctggccga cgcggtggtg atcatccccg
2281 ccgcgcagaa gaccgatcac ggctcgca ca ttctcgcgga gtaocgcgga tcccttttgc
2341 agcaggtgct gtctcgtcgc accgaagccg tgttccagtc gctgtgggat cacaccgagg
2401 tcgaggccga ggaactctgg acgcgccacg ccaactcga gtgacccgga cctcga

開裂部位

↓
MASSVMSSAAVATRGNGAQASMVAFPTGLKSTASFPVSRKQNLDTSIASNGGRVSEITQAAEADGAVK
VVGDDITNNLSLVRDEVADTAAKVDPEQVAVLARQIVQPGRVFVAGAGRSLVLRMAAMRLMHFGLTVH
VAGDTTTPAISAGDLLLVASGSGTTSQVVKSAETAKKAGARIAAFTTNPDSPLAGLADAVV IIPAAQKT
DHGSHISRQYAGSLFEQVLFVVTEAVFQSLWDHTEVEAEELWTRHANLE

FIG. 7

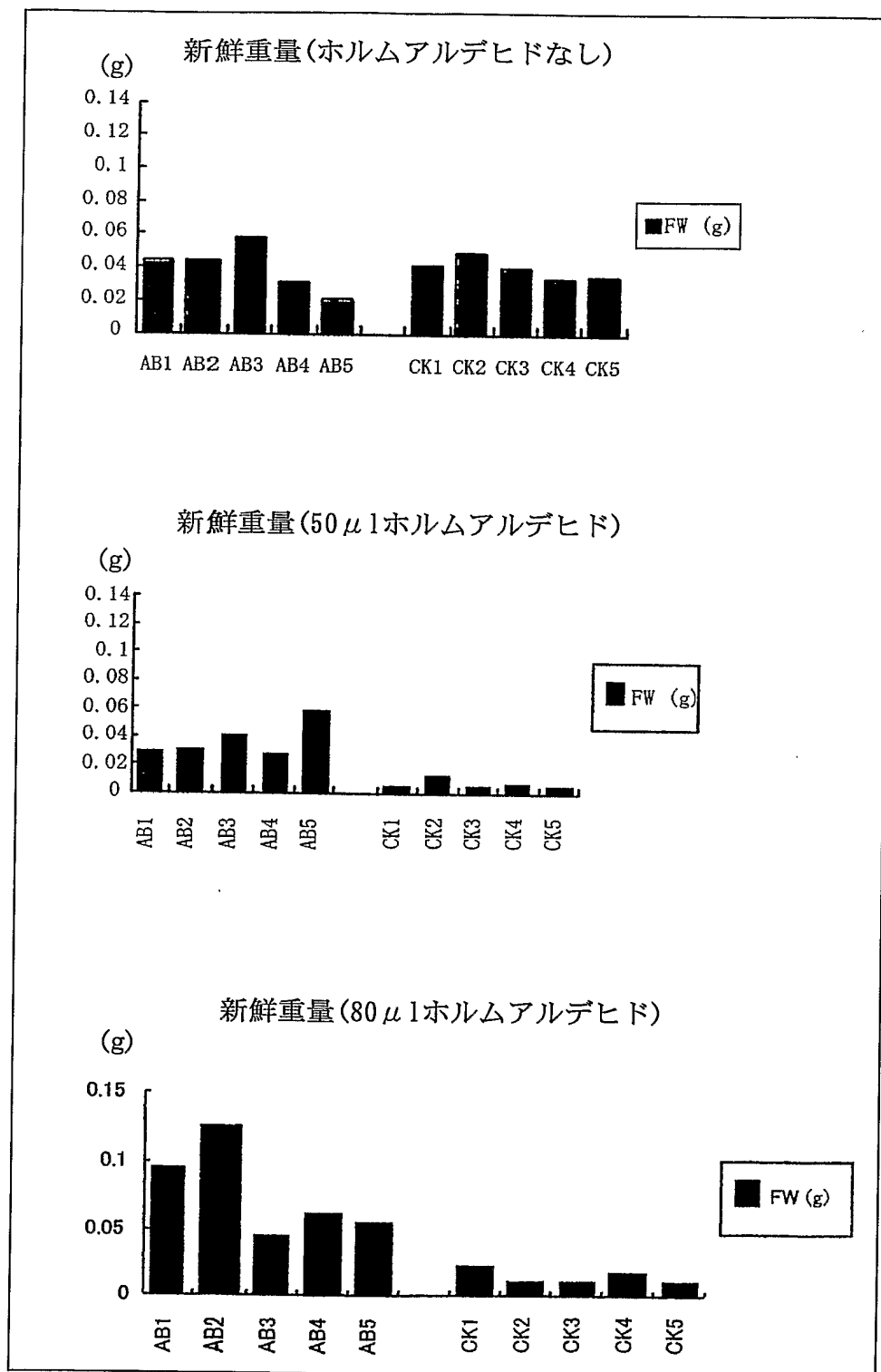


FIG. 8

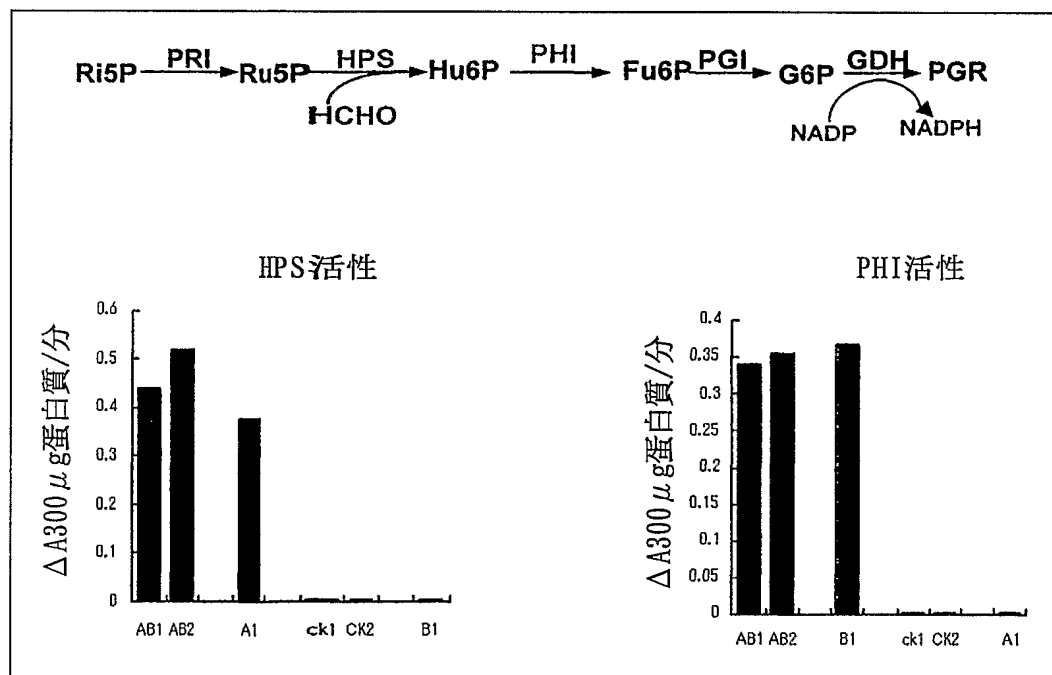


FIG. 9

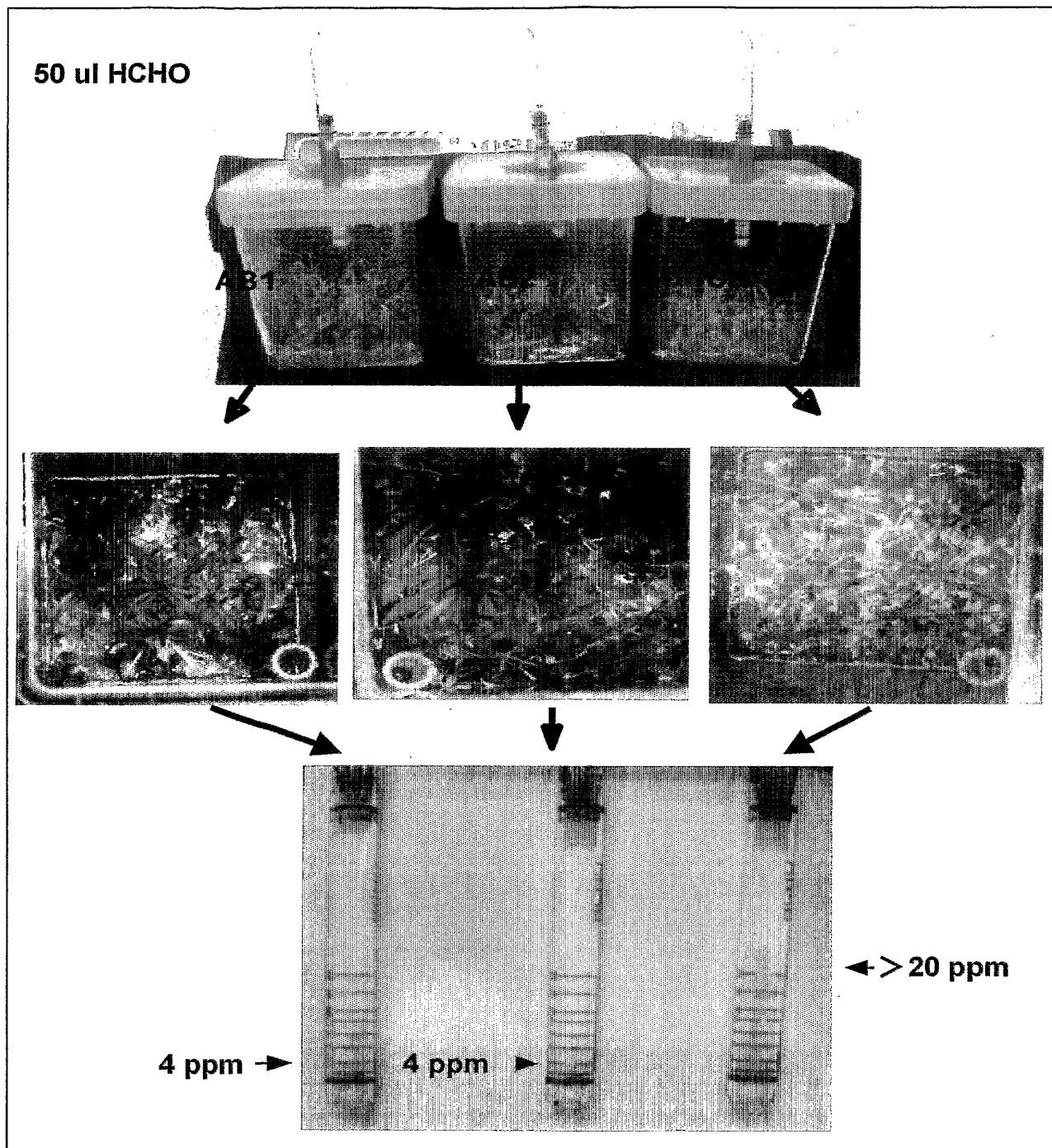


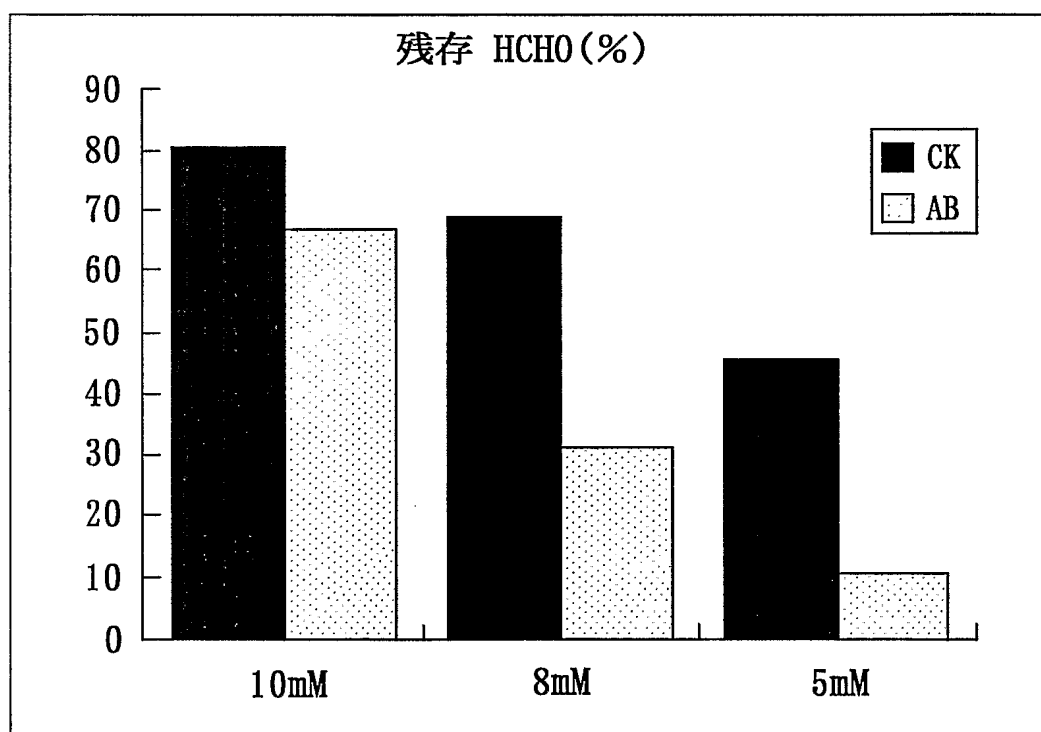
FIG. 10

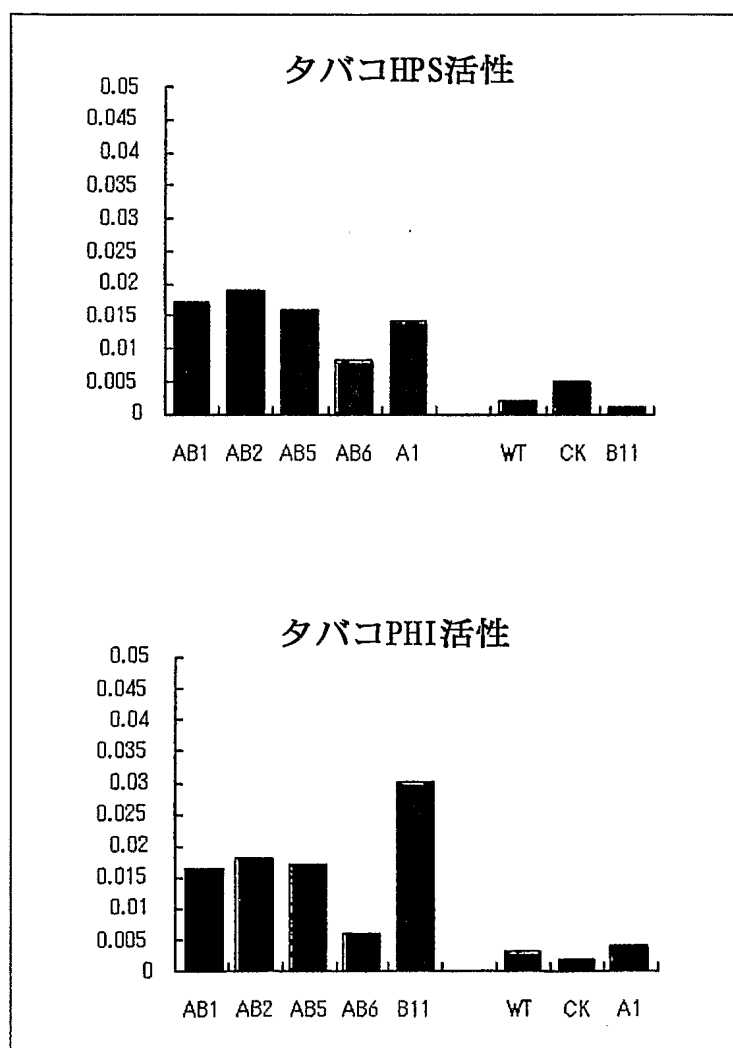
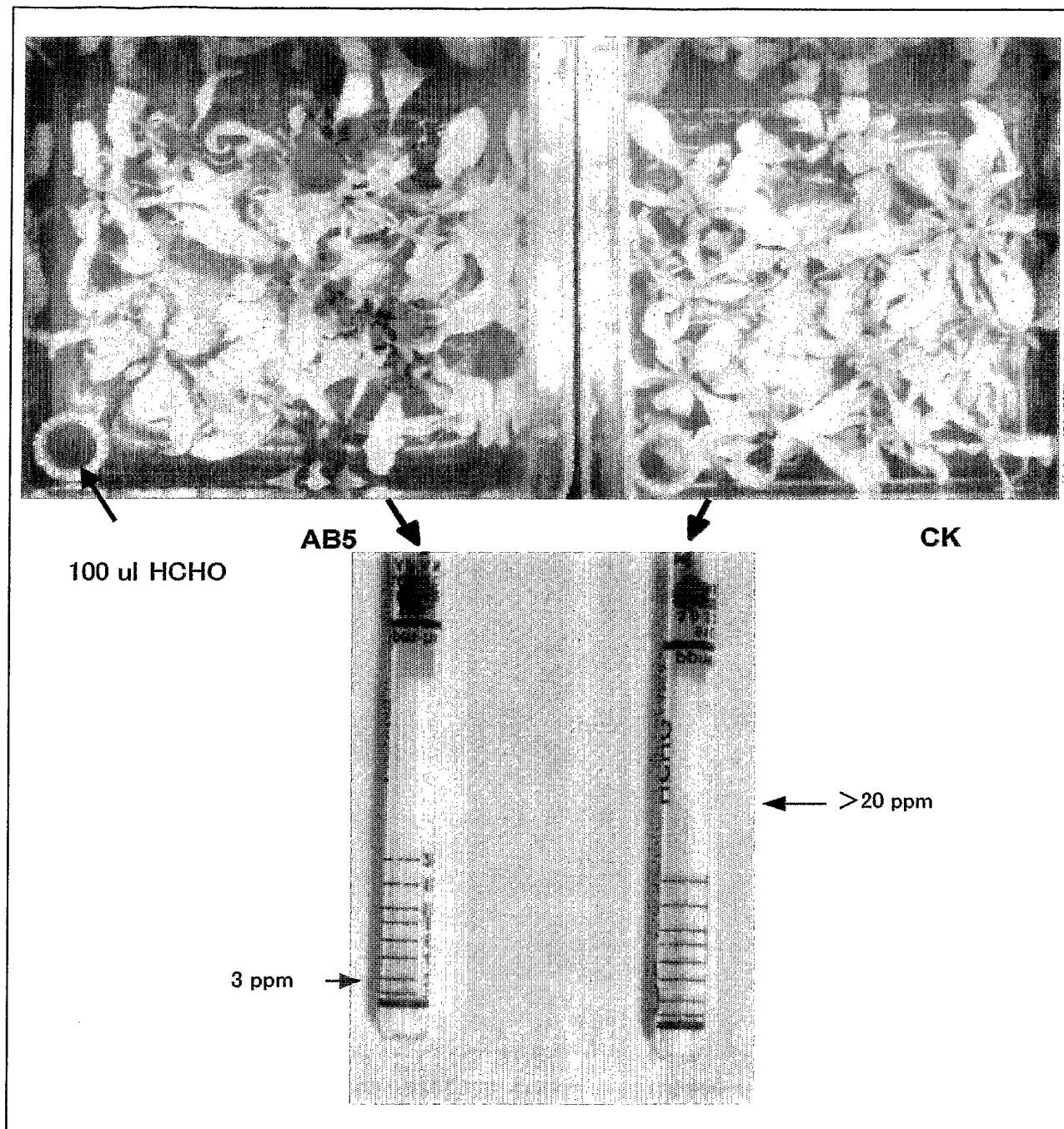
FIG. 11

FIG. 12



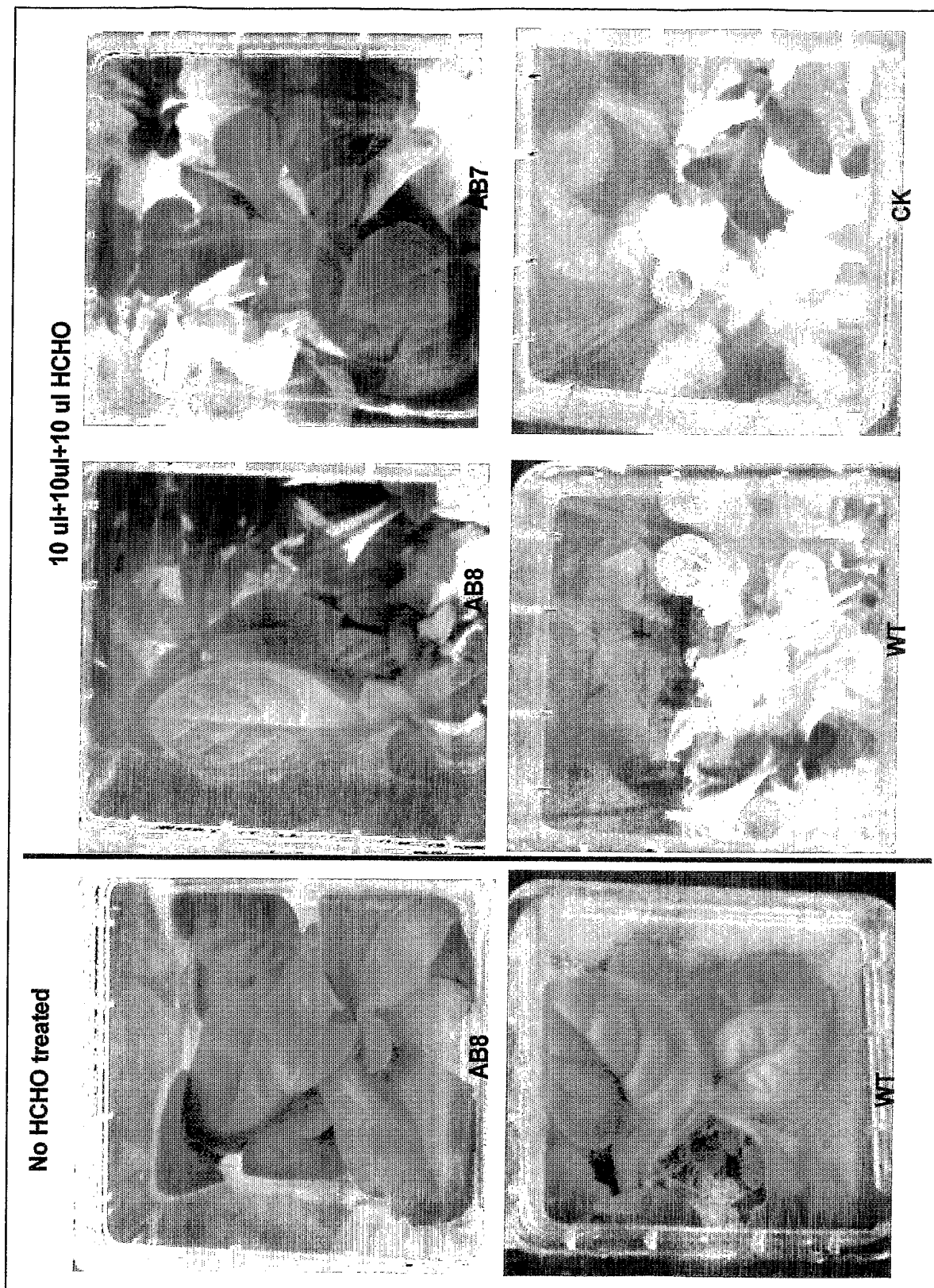


FIG. 13

クロロプラストを持たない根の生長への影響(形質転換タバコ)

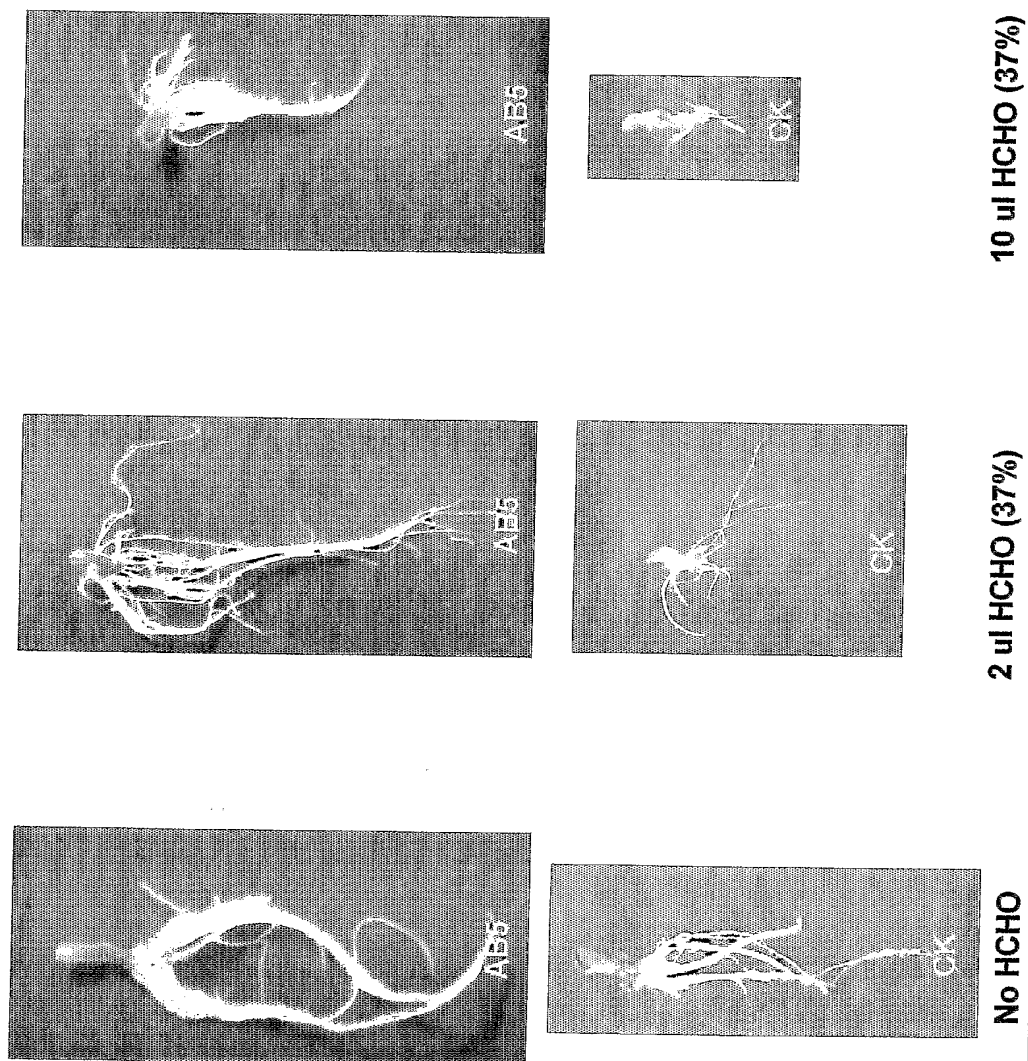
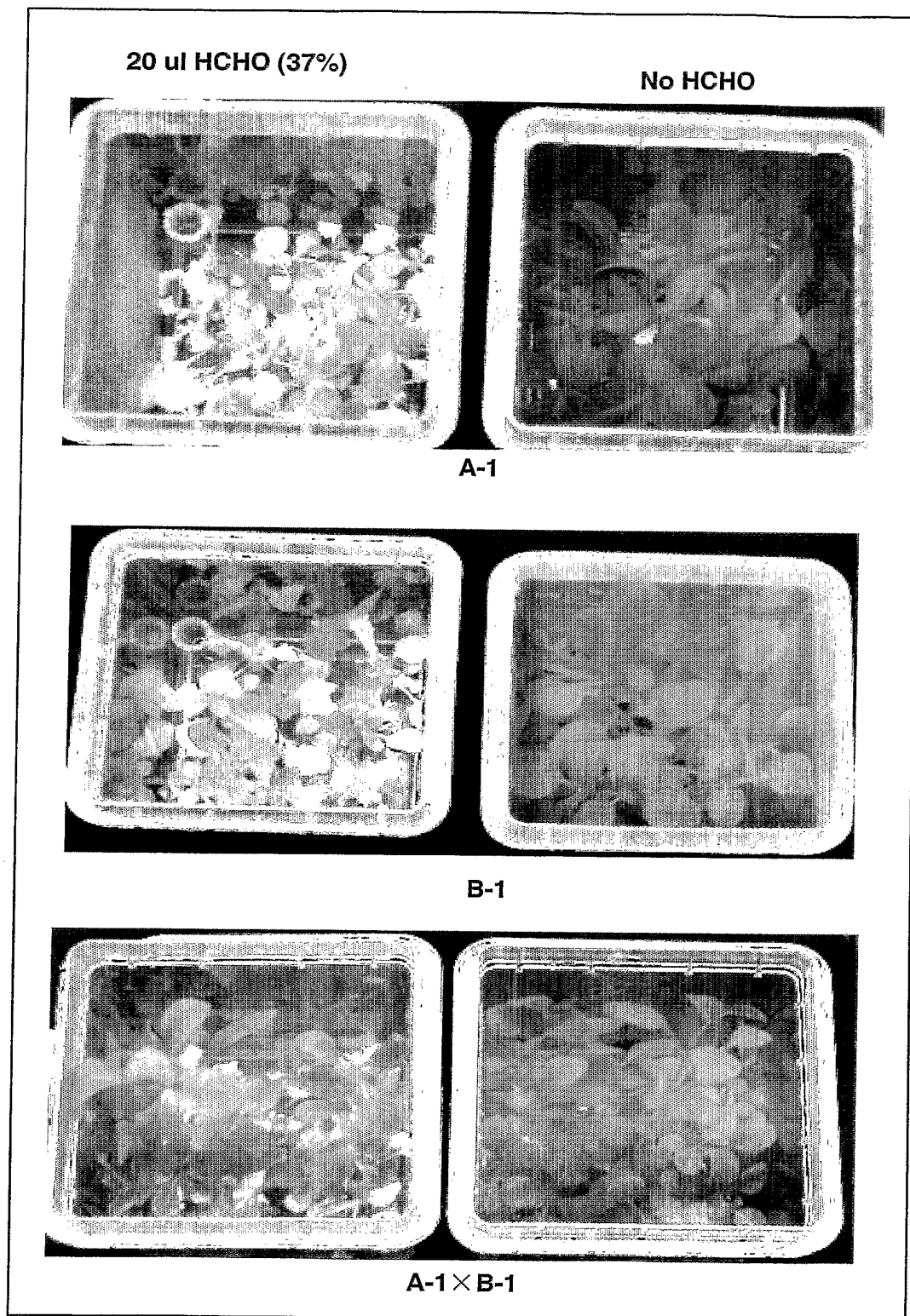


FIG. 14

FIG. 15



SEQUENCE LISTING

<110> Kyoto University
<120> A method to provide formaldehyde resistance to a plant and a method to have a plant absorb environmental formaldehyde
<130> 267
<160> 4
<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 1
gcttgcaagg ggtaaccatg acg 23

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 2
tctagaggat caggcgatcg c 21

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 3
gcttgcaagg ggtaaccatg acg 23

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
<400> 4
tctagatccg ggtcactcga g 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/52, 15/61, A01H5/00, C02F3/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, A01H5/00-5/12, C02F3/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-34368 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 05 February, 2002 (05.02.02), & US 2002-83492 A1	1-20
A	Ryoji MITSUI et al., "Formaldehyde no Kotei wa Methylo-troph Dakeno Tokugi ka?", Kagaku to Seibutsu, 1999, Vol.37, No.5, pages 284 to 286	1-20
A	Tsuneo YAMADA et al., Iwanami Seibutsugaku Jiten, second edition, Kabushiki Kaisha Iwanami Shoten, 1977, pages 215 to 216	1-20
A	JP 11-341928 A (Japan Tobacco Inc.), 14 December, 1999 (14.12.99), (Family: none)	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 March, 2005 (10.03.05)Date of mailing of the international search report
29 March, 2005 (29.03.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/52, 15/61, A01H5/00, C02F3/32

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90, A01H5/00-5/12, C02F3/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-34368 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2002.02.05 & US 2002-83492 A1	1-20
A	三井亮司他著, ホルムアルデヒドの固定はメチロトロフだけの特 技か?, 化学と生物, 1999, Vol. 37, No. 5, p. 284-286	1-20
A	山田常雄他編, 岩波 生物学辞典 第2版, 株式会社岩波書店 1977, p. 215-216	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.03.2005

国際調査報告の発送日

29.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 11-341928 A (日本たばこ産業株式会社) 1999. 12. 14 (ファミリーなし)	1-20